

허파혈관주위세포에서 저산소증에 의한 생존능의 억제와 유전자 발현의 변화

중앙대학교 의과대학 내과학 교실, 국립보건원 생명약부 심혈관질환과¹
신종욱, 김계영¹, 이영우, 정재우, 이병준, 김재열, 조인호¹, 박인원, 최병휘

Inhibition of Viability and Genetic Change in Hypoxia-treated Lung Pericytes

Jong Wook Shin, M.D., Kae-Young Kim, PhD.¹, Young Woo Lee, M.D., Jae Woo Jung, M.D.,
Byoung Jun Lee, M.D., Jae-Yeol Kim, M.D., Inho Jo, PhD.¹, In Won Park, M.D., Byoung Whui Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, Chung-Ang University School of Medicine, Seoul, Republic of Korea

¹Division of Cardiovascular Diseases, Institute of Biomedical Research, Korean National Institute of Health, Seoul, Republic of Korea

Background : Lung pericytes are important constituent cells of blood-air barrier in pulmonary microvasculature. These cells take part in the control of vascular contractility and permeability. In this study, it was hypothesized that change of lung pericytes might be attributable to pathologic change in microvasculature in acute lung injury. The purpose of this study was how hypoxia change proliferation and genetic expression in lung pericytes.

Methods : From the lungs of several Sprague-Dawley rats, performed the primary culture of lung pericytes and subculture. Characteristics of lung pericytes were confirmed with stellate shape in light microscopy and immunocytochemistry. 2% concentration of oxygen and 200 μ M CoCl₂ were treated to cells. Trypan blue method and reverse transcription-polymerase chain reaction were done.

Results : 1. We established methodology for primary culture of lung pericytes. 2. Hypoxia inhibited cellular proliferation in pericytes. 3. Hypoxia could markedly induce vascular endothelial growth factor(VEGF) and smad-2. 4. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) was also induced by 2% oxygen.

Conclusion : Viability of lung pericytes are inhibited by hypoxia. Hypoxia can stimulate expression of hypoxia-responsive genes. Pericytic change may be contributed to dysfunction of alveolar-capillary barrier in various pulmonary disorders. (*Tuberc Respir Dis* 2004; 57:37-46)

Key words : pericytes, hypoxia, VEGF, Smad-2, HIF-1 α , blood-air barrier.

서 론

허파 순환 중 허파파리-모세혈관의 순환 혈액량은 60-200 ml이며¹ 혈액 공기 장벽을 통하여 산소, 이산화탄소와 같은 기체의 교환과 전해질, 용질을 포함하는 체액의 이동이 일어난다. 허파파리-모세혈관 장벽은 혈관내피세포, 상피세포, 기저막, 간질조직으로 이루어져 있다. 지금까지 혈액-공기 장벽의 투과성에 관한 연구는 내피세포를 대상으로 세포막 투과성, 틈새

이음(gap junction), 혈류, 림프액, 상피세포의 투과성, 표면활성제(surfactant) 등의 역할에 대해서 중점적으로 이루어져 왔다.

모세혈관에서 투과 기능의 이상은 염증 반응의 가장 중요한 표지자로서 간질 조직에 세포외 간질액이 축적되어 부종을 일으킨다. 허파에서 발생하는 다양한 염증에 의해 혈액-공기 장벽의 투과성이 증가하게 되면 폐수종이 발생한다.

혈액 공기 장벽의 구성 성분으로서 혈관주위세포의 존재와 역할에 대해서는 최근에 알려지기 시작하였다². 이 세포는 혈관평활근세포가 존재하지 않는 모세혈관, 모세혈관전 소동맥, 모세혈관후 소정맥 부위에 주로 분포하는 세포로서 수축 기능에 의한 혈류의 조절과 혈관의 투과성의 조절에 관여한다³. 따라서 많은 폐질환에서 폐혈관의 변화에 관한 혈관주위세포의 역할은 병인적인 측면에서 중요한 의미를 가질 것이다.

만성 폐고혈압, 급성폐손상/급성호흡곤란증후군

본 연구는 1999년도 중앙대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence : Byoung Whui Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, Chung-Ang University Hospital Hangeang Ro 3 Ga, Seoul, Republic Of Korea

Phone : 082-02-748-9878, 082-02-2260-2439

E-mail : bwchoimd@nownuri.net

Received : Jun. 2. 2004.

Accepted : Jul. 6. 2004.

(Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome; 이하 ALI/ARDS)등은 미세혈관 투과성이 변하거나 혈관 개형(vascular remodeling) 등을 동반하는 대표적인 질환이다. 만성 폐고혈압은 폐소동맥, 폐소정맥, 폐모세혈관에서 광범위한 혈관 개형에 의한 혈관 수축으로 발생할 수 있으며 저산소 상태에서 혈관주위세포의 형태학적, 기능적 변화가 기여할 수 있다⁴. ALI/ARDS는 혈액-공기 장벽의 기능 이상에 의해 혈관투과성이 증가하고 증식기와 섬유화기를 지나 혈관 개형에 의한 폐고혈압이 발생하는 것을 특징으로 하는 폐질환이며, 폐 전체에 걸쳐서 미만성 간질성 폐부종이 발생하고 저산소증이 지속되어 40-60%의 환자에서는 치명적인 예후를 보인다⁵.

ALI/ARDS에서 광범위한 조직의 손상과 간질조직의 섬유화, 환기와 관류의 불균형, 셉트의 발생 그리고 혈관의 개형으로 세포는 저산소증에 노출되게 되며, 혈관을 구성하는 세포는 저산소증에 따른 여러 가지 반응을 보일 것이다. 저산소증에 노출되면 다양한 세포학적, 생화학적, 생리적인 변화와 자극이 생기므로 단순히 혈관의 수축, 근육화만으로는 복잡한 현상을 설명할 수는 없다.

저산소증에 의해 주로 반응하는 허파 혈관은 모세혈관 전 저항혈관(precapillary resistance vessels)으로 혈관이 근육화(muscularization) 되어 수축하게 된다. 그런데 근육화의 기원이 되는 세포는 아직까지 확정적으로 알려져 있지 않으며 허파혈관주위세포가 평활근세포의 전구세포(precursor cells)임을 고려해볼 때 허파혈관주위세포가 저산소증에 대하여 나타내는 반응은 이러한 질환의 병리기전을 이해하는데 중요한 의미를 가지게 될 것이다.

저산소증에 따른 세포의 증식에 대해서는 연구마다 상이한 결과를 보이지만 이는 세포의 종류에 따라 저산소증에 대한 감수성이 다르기 때문이고 같은 종류의 세포라 하더라도 중간 특이성, 해부학적 위치에 따라 반응이 달라질 수 있을 것이다. 혈관평활근세포와 섬유아세포는 저산소증에 대하여 증식이 촉진되나 내피세포는 대개 감수성이 떨어져 증식의 유의한 증가가 없는 것으로 일찍이 알려졌다^{6,7}.

저산소증에 대한 혈관내피의 가장 초기 반응 중의 하나는 염증반응이며 양성 조절인자와 음성 조절인자

의 균형에 따라서 저산소증에 혈관내피세포가 적응을 하게 된다. 저산소증에 대한 반응 동안에는 유전자의 전사 조절이 결정적인 역할을 하며 여러 종류의 유전자 발현 경로가 관여한다. 만성 저산소증상태에서는 hypoxia-inducible factor- α (이하 HIF-1 α)에 의해 직접적으로 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; 이하 VEGF)나 erythropoietin 등이 발현된다^{8,9,10}. 그리고 Transforming Growth Factor β (이하 TGF- β) family, Platelet Derived Growth Factor (PDGF)를 포함하여 여러 가지 성장인자나 ICAM-1 등의 촉진자(promoter) 유전자 또한 발현된다. TGF- β 는 혈관의 염증성 반응이나 혈관 개형에서 활성이 증가한다^{11,12,13}. TGF- β 는 세포막 수용체에 결합한 후 세포질내 smad 단백질을 인산화시키고 smad는 핵 내로 전위되어 핵산에 결합한 후 다양한 유전자의 발현을 유도한다^{14,15}. 실험동물과 내피세포를 이용한 최근 연구에 의하면 Smad 단백질은 shear stress에 대한 내피세포의 반응과^{16,17} 지질다당체(lipopolysaccharide)에 대한 염증반응을 조절하는 것으로 알려졌다¹⁸.

혈관내피세포에서는 저산소증에 의해 프로스타글란딘이 분비되어 혈관 개형에 관여하며 이의 조절은 cyclooxygenase(COX)-2에 의한 것으로 알려져 있다¹⁹. 평활근세포에서는 저산소증에 의해 Cox-2의 발현이 증가되고 이에 의해 증식이 조절된다²⁰.

본 연구에서는 혈액-공기 장벽의 구성 세포인 허파 혈관주위세포를 체외에서 일차 배양하는 방법을 확립하고 일차 배양된 허파혈관주위세포가 저산소 상태에 노출되었을 세포 증식에 미치는 효과와 저산소증에 의해 유도되는 대표적인 유전자의 발현이 어떻게 변하는지를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 허파혈관주위세포의 일차배양

실험에 이용한 쥐는 Sprague-Dawley 쥐이며 일차 배양할 때마다 150 g에서 200 g사이의 몸무게를 지닌 수컷 흰쥐 5-10마리를 사용하였다. pentotal sodium (중외제약, Korea)을 120 mg/kg로 쥐의 복막 안으로 주사하여 마취시켰다.

원주의 허파를 분리하여 calcium- and magnesium- free phosphate-buffered saline(PBS, GIBCO-BRL, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY)과 항생제(0.5% penicillin/streptomycin/amphotericin B, GIBCO-BRL, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY)가 든 비이커에 담고 동일한 용액으로 2회에 씻었다. 혈관평활근세포와 섞여 배양되는 것을 방지하기 위하여 허파 가장자리 부위 2 mm 만을 가위로 잘라내었다. 떼어 낸 조직을 가위로 잘게 만든 뒤, 이 조직에 효소(collagenase type Ia(GIBCO-BRL Invitrogen Corporation, Grand Island, NY) 1000 units/ml ; 0.5% bovine serum albumin(Sigma chemical, St. Louis, MO) ; pronase E(Sigma chemical, St. Louis, MO) 3 units/ml; deoxyribonuclease I(Sigma chemical, St. Louis, MO) 0.5 units/ml)를 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 뒤, 균질기(homogenizer)의 유봉(pebble)으로 부드럽게 두 번 균질화(homogenization)를 시켜 미세혈관이 조직으로부터 느슨하게 떨어지도록 하였다. 다시, 이전과 같은 효소액을 처리하여 30분간 반응시켰다. 이 조직-효소액을 100 μ m 크기의 구멍을 가진 체(mesh; Sigma)에 통과시켰고, 1% 우태아혈청[Fetal Bovine Serum(FBS; Hyclone, South HyClone road Logan, Utah)], 0.5% 항생제(penicillin/streptomycin/amphotericin B; GIBCO-BRL Invitrogen Corporation, Grand Island, NY)가 든 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO-BRL Invitrogen Corporation, Grand Island, NY)로 씻어주고 체 위에 남은 조직들은 버리고 체 밑으로 걸러진 조직액을 시료로 사용하였다. 이 조직액을 1200 rpm으로 5분간 원심 분리하여 부유액은 버리고 침전물을 취하였다. 여기에 적혈구 용해 완충제[red blood cell lysis buffer(Sigma chemical, St. Louis, MO)] 10 ml를 첨가하고 재부유한 뒤, 4°C에서 10분간 두었다. 그 뒤, 이를 1,200 rpm으로 5분간 원심 분리하였고 침전 조직액을 PBS로 2회 세척하였다. 마지막으로 남아 있는 조직 침전물에 10% FBS와 0.5% 항생제가 든 DMEM으로 재부유시켜 100-mm 세포배양접시(Corning Incorporated, Corning, NY)에 옮기고 37°C 세포배양기에서 키웠다. 세포가 세포배양접시 면적의 80% 정도의 밀도로 자란 뒤에는 PBS 용액으로 1회

세척한 뒤, 한 개의 100-mm 지름 세포배양접시 당 0.05% Trypsin-0.53mM EDTA(4Na) 2 ml를 가하여 37°C 5% CO₂ 세포배양기에서 5분간 반응시켰다. 세포가 배양접시의 바닥에서 떨어지기 시작하는 순간에 trypsin/EDTA 용액에 FBS를 첨가하여 효소의 작용을 억제시키고 세포의 손상을 최소화시켰다. 세포를 15 ml 원심분리튜브(Becton Dickinson Labware, Franklin lakes, NJ)에 모은 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하였고, 10% FBS, 1% 항생제가 든 DMEM으로 세포를 재부유하고 적당한 세포 밀도로 계대 배양하였다(대개 1:3의 비율). 본 실험에는 제10계대 이전의 세포를 이용하였다.

2. 백서폐혈관주위세포의 특성 확인 : 역상 광학현미경 및 면역화학 염색

처음 세포배양접시에 자라기 시작할 때와 70-80% 밀도로 자랐을 때, 활발히 증식할 때와 세포 손상에 의해 사멸할 때의 세포학적 특징들을 Zeiss 현미경을 통하여 관찰하였다.

혈관내피세포, 혈관평활근세포, 상피세포와의 감별은 광학현미경, 면역세포화학 염색을 시행하였으며, 혈관평활근세포와의 감별을 위해 광학현미경으로 hill-and-valley 모양의 유무와, 면역화학적 염색을 시행하였는데, 표지자로 α -smooth muscle actin, desmin을 사용하였다. 혈관내피세포와의 감별은 광학현미경으로 90-100% 밀도(confluent density)에서 자갈모양(cobble stone appearance)의 유무, vimentin, factor-VIII-related antigen의 염색으로 감별하였다. 기도상피세포와의 감별을 위하여 Epithelial Membrane Antigen(EMA)을 사용하였다. poly-L-lysine이 입혀진 chamber slide well(NUNC)에 2×10^5 개의 세포를 10% FBS가 든 DMEM으로 배양하였다. 배양액을 걷어내고 95% 알코올 용액으로 1시간 동안 고정하였다. 그런 뒤 증류수로 5분간 세척하였고 이를 세 번 반복하였다. 3% H₂O₂ 용액에 10분간 넣어 내인성 과산화효소(peroxidase)의 활성을 없앴다. 다음 단계로, 증류수로 3회에 걸쳐 5분씩 반복 세척하였다. 그런 뒤, 각각의 일차 항체 희석액을 chamber를 가득 덮을 정도로 하여 humidity chamber속에서 하룻밤 동안에 반

응시켰다. Tris buffer(0.05M pH7.6)를 사용하여 5분 동안 3회 반복하여 세척한 뒤 aminoethylcarbazole(AEC)을 사용하여 현미경하에서 발색을 확인하였다. 이 때, AEC 용액은 A, B, C 3개로 구성되어 있으며 조제는 증류수 1 ml 당 A, B, C 용액 각각을 한 방울 씩 떨어뜨려 잘 섞은 후 1회 사용 시 100 μ l 정도 되게 사용하였다. Mayer's hematoxylin으로 3분간 대조 염색을 실시하였고 glycerol 젤로 mounting하였다.

3. Hypoxia, CoCl₂의 처리

세포 또는 조직 배양 실험에서 “생리적” 저산소증과 유사하게 만들기 위한 산소의 농도는 일반적으로 1-5%이며, 세포의 스트레스 반응이나 세포 주기 정지 (cell cycle arrest) 실험에서는 이 보다 더 낮은 산소 농도에서 실험을 수행한다. 코발트(cobalt chloride; 이하 CoCl₂)는 heme moiety에 있는 철(iron)을 대체하여 환원상태를 지속시켜 저산소증과 유사한 상태를 만드는 전이금속원소이다.

본 연구에서는 2% O₂가 되게 맞춘 세포배양기를 이용하여 저산소 조건을 만든 후 세포를 3시간, 24시간, 48시간 동안 노출시켰고 유전자 발현을 관찰하였다. 염화 코발트(CoCl₂)는 200 μ M의 농도로 하여 세포에 3시간, 24시간, 48시간 동안 처리한 후 생존능과 유전자 발현을 분석하였다.

4. 세포 생존능 분석 : Trypan Blue Method

0.4% Trypan Blue Stain 용액(GIBCO-BRL)을 사용하여 세포막을 염색하였고 Hemacytometer(MA-RIENFELD, Germany)로 10개의 field 내 세포수를 세어 평균값을 결과로 취하였다.

5. 저산소 상태에 대한 VEGF, HIF-1 α , smad-2, COX-2의 발현 : 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

총 RNA은 TRI reagent(Molecular Research Cen-

ter, Inc. Cincinnati, OH)를 사용하여 추출하였다. 정제한 RNA의 integrity와 질(quality)은 formaldehyde denaturing agarose-gel electrophoresis와 분광광도계에 의한 A260/A280 비의 측정으로 조절하였다. 제 1쇄(first strand)의 합성을 위하여, total RNA 2 μ g을 4 μ l의 증류수에 녹였고, 70 °C에서 5분 동안 가열하였다. 그 뒤, 얼음 속에서 냉각시켰다. 총 부피가 20 μ l로 만들면서 1 mM의 dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM의 DTT(dithiothreitol), 5 pmol의 oligo(dT)15/ μ l (Promega), 1 unit/ μ l의 RNasin, 200 unit Superscript RT(Promega)가 포함되게 제작회사에서 공급하는 완충액을 첨가하였다. 2 μ l의 cDNA를 VEGF, HIF-1 α , COX-2, smad-2의 primer 4 μ M, 10 x buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U Taq polymerase를 만들어, Perkin-Elmer thermal cycler(GeneAmp PCR system 9600)로 PCR cycle에 따라 증폭시켰다. 사이클링 프로그램은 94°C에서 30초, 62°C에서 30 초, 72°C에서 30초 동안 순서대로 반복하여 25 cycle 동안 반응시킨 뒤, 프로그램이 종료하게 하였다. 5 μ l의 PCR산물을 Tris/boric acid/EDTA buffer속에서 1% 아가로스겔을 써서 전기영동하여 확인하였고 28S ribosome RNA로 샘플의 부하량을 상대적으로 비교하였다.

6. 통 계

결과의 분석에 사용한 통계 프로그램은 SPSS 11.0이었으며, 세 군 이상의 평균의 비교는 Kruskal-Wallis one-way ANOVA (Analysis of Variance)를 통하여 분석하였다.

결 과

1. 폐혈관주위세포의 일차 배양(Primary Culture of Rat Lung Pericytes)

1) 일차 배양 및 계대 배양 시 세포학적 형태 관찰 (Figure 1)

150-200 g의 수컷 흰쥐로부터 허파혈관주위세포 배양을 시작한 뒤(Figure 1), 처음으로 세포가 보이기 시작하는 시각은 대략 3일 내지 5일 걸렸다. 10마리로부

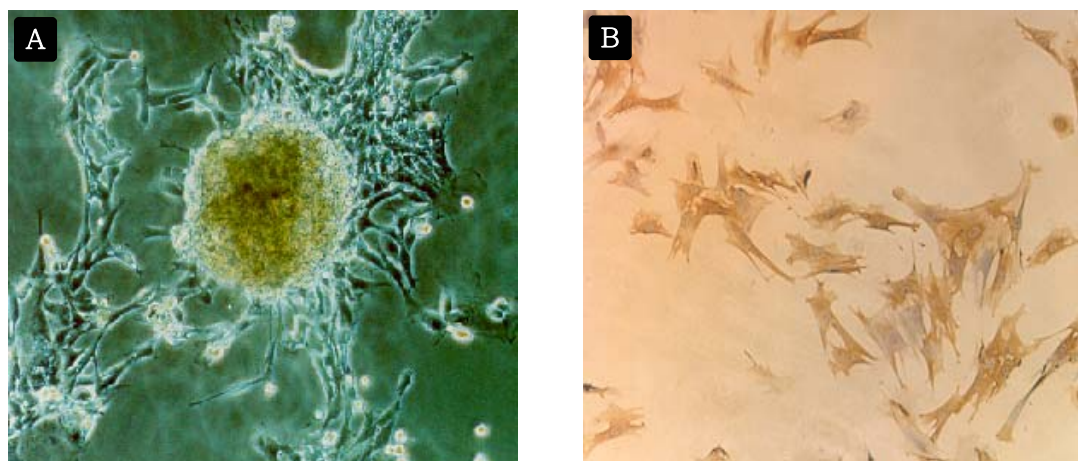


Figure 1. Characterization of Rat Lung Pericytes

A Light Microscopy (x 200) : Within seven days of primary culture, the lung pericytes were successfully implanted on the 100-mm cell culture dishes and migrated from the conglomerated tissues. Stellate shape and dendrite-like cytoplasmic processes can characterize these cells from the other vascular and interstitial cells of lungs.

B Immunocytochemical stain : Pericytes were stained strongly with α -smooth muscle actin, which were negative in endothelial cells.

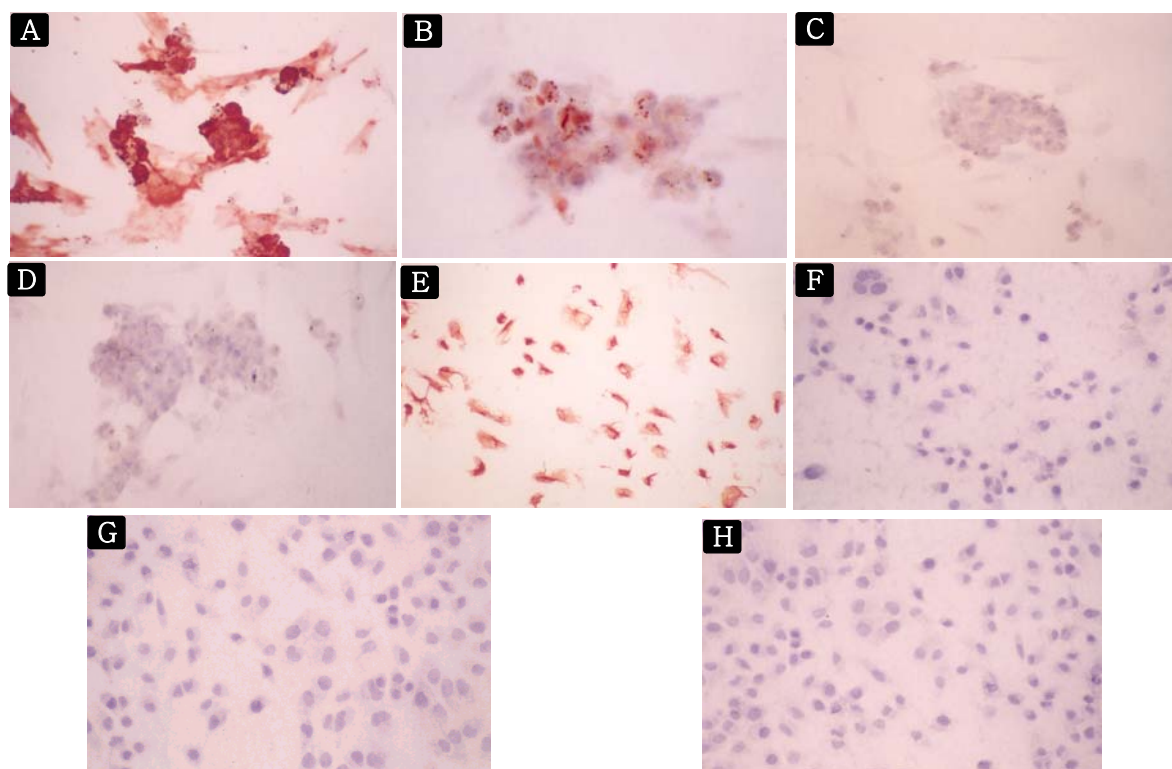


Figure 2 Immunocytochemical Staining for Characterization of Rat Lung Pericytes (A, B, C, D) in contrast to Human Umbilical Vein Endothelial Cells (E, F, G, H).

A Positive Staining for α -Smooth Muscle Actin, **B**. Positive Staining for Vimentin, **C**. Negative Staining for Epithelial Membrane Antigen, **D**. Negative Staining for Factor VIII-related Antigen, **E** Positive Staining for Factor VIII-related Antigen, **F**. Negative Staining for α -Smooth Muscle Actin, **G**. Negative Staining for Vimentin, **H**. Negative Staining for Epithelial Membrane Antigen

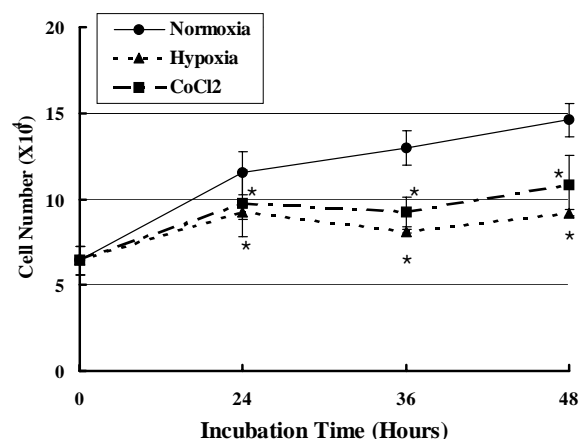
터 일차 배양이 된 뒤, 다시 계대 배양하는 데는 약 7 일 내지 10일 걸렸다. 처음 계대배양하기 전까지는 20% FBS가 든 DMEM으로 세포를 키우고 그 뒤 계대 배양할 때는 10% FBS로 낮추어 배양하면 세포가 안정적으로 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 처음에는 다른 세포들도 함께 자라지만, 계대 배양하는 과정에서 거의 95% 이상 혈관주위세포로만 자라는 것을 확인할 수 있었다. 실험을 반복할 때마다 항상 같은 속도로 자라는 것은 아니었지만, 항상 일정한 특징적인 별모양(stellate or denrite-like)의 세포 형태를 관찰하였다.

2) 허파혈관주위세포의 특성 조사(Figure 2)

광학현미경으로 관찰 했을 때, 여러 개의 세포질 돌기가 있어 별 모양으로 생긴 혈관주위세포들이 확인되었고 계대 배양 시 순수하게 이러한 세포들만이 자라는 것으로 혈관주위세포임을 확인할 수 있었다. 내피세포, 혈관평활근세포, 상피세포와의 더 확실한 감별을 위하여 세포면역화학적 염색을 시행한 결과, 허파혈관주위세포는 α -smooth muscle에 대하여 강하게 염색되면서 factor VIII-related antigen(von Willebrand factor)에는 음성으로 염색되는 것으로 혈관내피세포와 구분할 수 있고, 뾰족한 밀도(confluent density)로 자랐을 때 혈관내피세포는 조약돌 모양(cobble stone appearance)의 세포군을 이루나 혈관주위세포는 그러한 모습은 관찰 할 수 없었다. 이 세포는 Vimentin에 양성으로 염색이 되며, desmin에 대하여 음성으로 염색되는 것으로 혈관평활근세포와 구분할 수 있었다. EMA에 대하여 염색이 되지 않는 것으로 상피세포와는 다른 기원임을 알 수 있었다.

2. 세포 증식능의 변화(Figure 3)

2% O_2 , $CoCl_2$ 를 처리하여 세포 생존능을 본 실험 결과는 대조군 (normoxia)군은 계속 증식을 하는 반면, 2% O_2 처리군과 200 μM $CoCl_2$ 처리군에서는 24시간 부터 증식이 줄어들기 시작하여 36시간과 48시간째에는 유의하게 대조군에 비해 생존능이 억제되는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$).



(* : hypoxia/ $CoCl_2$ versus normoxia, $p < 0.05$)

Figure 3. Change of cell proliferation by hypoxia and $CoCl_2$ treatment in rat lung pericytes.

Two percent O_2 and 200 μM $CoCl_2$ were treated to rat lung pericytes. Within 24 hours of incubation, The proliferation of hypoxia/ $CoCl_2$ -treated cell groups were significantly decreased.

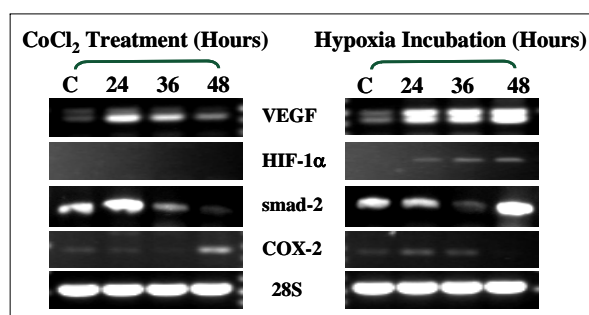


Figure 4. Change of gene expression by hypoxia and $CoCl_2$ treatment in rat lung pericytes.

Transcription of VEGF was markedly up-regulated in $CoCl_2$ and 2% O_2 . Smad-2 was up-regulated in 24 hours incubation of 200 μM $CoCl_2$ and 48 hours incubation of 2% O_2 . Transcription of HIF-1 alpha was slightly increased in 2% O_2 . COX-2 was increased in 48 hours of 200 μM $CoCl_2$.

3. 2% O_2 와 200 μM $CoCl_2$ 에 의해 유도되는 Hypoxia-inducible gene의 발현(Figure 4)

1) VEGF의 발현

VEGF는 $CoCl_2$ 에 의해서는 24시간에 최고로 전사가 상승 조절되었고, 36시간까지 전사가 대조군에 비하여 전사가 증가되었다. 2% O_2 에서는 24시간부터 48시간에까지 지속적으로 전사가 현저히 증가하였다.

2) HIF-1 α 의 발현

HIF-1 α 는 CoCl₂에 의해 전사가 유도되지 않았으며, 2% O₂에 의해서는 24시간부터 서서히 발현되기 시작하여 48시간까지 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

3) smad-2의 발현

smad-2의 발현 양상을 살펴 보면, CoCl₂를 처리하였을 때 24시간째에 가장 강하게 발현되다가 그 이후 차츰 감소되는 양상이었고, 2% O₂에서는 24시간과 48시간째에 유전자 발현이 현저히 증가한 것을 볼 수 있었다.

4) COX-2의 발현

COX-2는 CoCl₂와 2% O₂의 처리에 VEGF나 smad2만큼 전사의 변화가 현저하지 않았다.

고 찰

본 연구를 통하여 흰쥐로부터 허파혈관주위세포를 순수하게 분리하여 일차 배양에 성공하였다. 저산소 상태에서 혈관주위세포는 증식이 억제되었으며, VEGF, smad-2의 발현이 현저히 증가하여 혈관의 손상 및 복구, 혈관의 개형에 대한 허파혈관주위세포의 역할에 대한 연구가 앞으로 흥미로울 것으로 기대된다.

허파파리 조직에서 수축능이 있는 세 가지의 세포는 평활근세포(smooth muscle cells), 허파혈관주위세포, 허파파리근섬유아세포(alveolar myofibroblasts)이며²¹ 허파파리벽에 존재하는 세포는 허파혈관주위세포와, 허파파리근섬유아세포이다. 이 들은 모양이나 기능이 각기 다르므로 일차 배양과정에서 구분을 하는 것이 중요하다. 허파파리 조직에서 혈관주위세포의 존재를 증명한 많은 연구들이 있었다²²⁻²⁶.

혈관주위세포의 일차배양은 D'Amore 등의 방법²⁷과 Speyer 등의 방법²⁸을 참고로 하여 실정에 맞게 변형하였다. 순수한 혈관주위세포의 배양을 위해서는 폐포근섬유아세포, 혈관평활근세포, 상피세포를 구분하여야하고, 세균의 오염을 주의하여야 한다.

폐혈관은 크게 탄력성 동맥(elastic artery)와 근육성 동맥(muscular artery)로 나뉘며, 탄력성 동맥은 전

형적 탄력 동맥(classical elastic artery)과 이행성 탄력 동맥(transitional elastic artery)으로 세분하며, 근육성 동맥(muscular artery)은 후층 근육 세절(thick muscular segment), 부분적 근육세절(partial muscular segment)와 비근육성 세절(nonmuscular segment)로 나누는데, 혈관주위세포는 전 폐야에 존재하지만 혈관평활근세포와 분리하여 배양하려면 비근육성 세절의 혈관을 분리하여야 한다. 이를 위해 늑막으로부터 2 mm까지의 폐 조직만을 분리하는 단계가 중요하다. 전체 일차 배양의 시간은 가능한 한 빠른 시간 내에 끝내야 한다. 이전 연구에서는 첫 효소 반응 시간을 30분이내로하고 이차 효소반응을 10분 정도로 하였으나 이에 따라 여러 번에 걸쳐서 실험했으나 이 시간 동안에는 혈관주위세포의 분리되는 효율이 낮았던 경우가 많았고, 일차 효소 반응 시간을 40분내지 60분, 이차 효소 반응시간을 20분 내지 30분간 시키면서 5분 간격으로 흔들어 주거나, shaking water bath에서 반응시키는 것이 더 효율적이었다. 일차 배양한 날로부터 3일내지 5일 경에 혈관주위세포가 자라기 시작하는 것을 확인할 수 있다. 7일 내지 열흘이 지난 후에는 증식속도가 빨라지기 시작하며 15일 경에는 계대배양을 하여야한다. 계대배양하기 전까지는 20%의 FBS에서 자라게 해 주다가 계대 배양 후부터는 10% FBS로 낮추어도 활발하게 증식하며, 혈관주위세포는 세포의 밀도에 민감하게 반응하며 증식하는 것을 관찰하였는데 계대배양은 1:3이 비율로 해 주는 것이 적당하였다. 계대배양의 횟수가 증가할수록 세포의 모양이 조금씩 변하는 것을 관찰 할 수가 있어 모든 실험은 3계대에서 8계대 사이에 배양한 세포를 이용하여 실험을 하였다. 광학현미경에서 보이는 형태학적인 다양성이 생화학적으로나 병태생리학적으로 있을 변화의 다양성에 대해서는 추후 연구가 있어야할 것으로 보인다.

이 번 연구를 통하여 대개 다른 세포의 오염은 거의 관찰할 수 없었으며 일차 배양의 초기에는 내피세포나 다른 세포의 오염을 광학현미경하에서 관찰할 수 있지만 계대배양을 하는 과정에서 대부분 활발한 혈관주위세포의 증식에 의해 압도되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 본 연구에서 미세혈관 각 부분 즉, 모세혈관 전 소동맥, 모세혈관, 모세혈관후 소정맥의 혈

관주위세포를 분리할 수는 없었는데, 이 점은 허파혈관주위세포의 형태학적 다양성, 생리학적 역할의 다양성을 구분하기 위해서는 분리 일차 배양할 필요가 있을 것으로 보인다.

아직까지 허파혈관주위세포에서 저산소증에 대한 효과를 관찰한 연구 결과는 없지만 소망막 혈관주위세포에서는 저산소증에 의해서 VEGF mRNA의 발현이 증가되었다²⁹. 허파에 VEGF유전자를 과다 발현시키면 폐수종이 유발될 수 있고³⁰ ALI/ARDS에서 VEGF는 폐수종을 증가시키며³¹ 내피세포의 투과성을 증가시키는 중요한 인자로 밝혀져 있다³². 본 연구에서 허파혈관주위세포에서 VEGF가 저산소증에 의해 강하게 발현되는 것을 처음으로 확인할 수 있었고 혈관과투과성 이상에 병태생리학적으로 중요한 기여를 할 수 있을 것으로 보인다.

혈관내피세포는 저산소 상태에서 HIF1a가 활성화되며, smad는 저산소 상태에서 염증 반응의 하나로 증가하게 되는 TGFβ family의 신호전달 물질인데 이 두 가지는 상호작용을 통해 상승적인 효과를 일으킨다^{33,34}. 허파혈관주위세포에서는 저산소증에 의해서 smad-2의 발현은 현저하게 상승하고 있었지만, 혈관내피세포와는 상대적으로 HIF1a의 발현은 현저하지 않은 점이 특징적이었다. 이러한 대조는 내피세포와 혈관주위세포의 상호작용측면에서 추후 연구로 규명해야할 점이라고 생각된다.

HIF1a는 세포내 산소 농도가 정상을 유지할 때는 proteasome에서 ubiquitination에 의해 분해되지만 CoCl₂나 저산소상태에서는 분해를 억제하고 안정적인 HIF1a가 핵내로 이동하게 되는데 HIF1a의 활성화를 촉진하는 CoCl₂가 이 세포에서 왜 HIF1a의 발현을 유도하지 못하는 지에 대한 연구나 단백질 수준에서의 HIF1a의 분해 억제에 의한 세포내 HIF1a의 증가가 있는지에 대한 추후 연구가 필요할 것이다.

내피세포와 폐동맥 평활근세포에서는 저산소증이 COX-2의 발현을 유도하고 세포의 증식을 조절한다^{19,20}. HIF1a와 마찬가지로 내피세포와 달리 허파혈관주위세포에서는 저산소증에 대하여 COX-2의 발현이 현저하게 변하지 않는 것은 이 세포의 특성이라 할 수 있을 것이다.

결론적으로, 본 연구의 결과로 허파혈관주위세포에서 저산소증에서 생존능이 억제되고 VEGF와 smad의 발현이 현저히 증가한 것은 ALI/ARDS에서 초기혈관의 과투과성이나 회복단계에서 혈관개형 등을 설명할 수 있는 한 모델이 될 수 있을 것으로 추측하며 향후 이 유전자들의 변화의 의미를 찾는 연구가 있어야 할 것이다.

요 약

연구 배경 :

허파혈관주위세포는 허파미세혈관에서 혈액공기 장벽을 이루고 있는 중요한 세포이다. 이 세포는 생리적으로 혈류와 혈관의 투과성을 조절하는 기능이 있다. 본 연구는 급성폐손상/급성호흡곤란증후군에서 혈관 과투과성 및 개형에 혈관주위세포의 변화가 중요한 역할을 할 것으로 보고 시작하게 되었다. 흰쥐로부터 일차 배양한 허파혈관주위세포에 저산소 상태를 만들었을 때, 세포의 생존능에 미치는 영향과 저산소증에 의해 유도되는 유전자의 발현을 살펴보았다.

방 법 :

흰쥐로부터 허파혈관주위세포를 일차 배양 및 계대 배양하였다. 광학 현미경 및 세포 면역 화학 염색으로 세포를 확인하였다. 2% O₂의 세포 배양기와 200 μM CoCl₂를 처리하였다. 세포의 증식은 trypan blue 염색 후 세포수를 세는 방법을 택하였다. 유전자 발현은 역전사 중합 효소 연쇄반응을 이용하였다.

결 과 :

1. 흰쥐로부터 허파혈관주위세포를 성공적으로 일차 배양 및 계대 배양할 수 있었다.
2. 2% O₂나 CoCl₂에서 혈관주위세포는 24시간, 36시간, 48시간에 증식이 억제되었다.
3. 허파혈관주위세포에 저산소 상태의 자극을 주면 VEGF와 smad-2의 발현이 현저하게 증가하였다.
4. 허파혈관주위세포의 HIF1a, COX-2는 저산소 상태에서 VEGF, smad-2에 비해 발현의 변화가 현저하지 않았다.

결 론 :

허파혈관주위세포를 일차 배양함으로써 허파파리혈

관장벽의 연구를 위한 한 모델을 만들었고, 저산소 상태에서 증식의 억제와 유전자 발현의 변화를 살펴봄으로써 허파혈관손상의 기전을 규명하는데 향후 도움이 될 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Weibel ER. Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol Rev* 1973;53:419-95
2. Epling GP. Electron microscopy of the bovine lung: The normal blood-air. *Am J Vet Res* 1964;25:679-89
3. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996;32:687-98
4. Meyrick B, Reid L. The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study. *Lab Invest* 1978;38:188-200
5. Flick MR, Matthay MA. Pulmonary Edema and Acute Lung Injury. In : Murray JF, Nadel JA, Mason RJ, Boushey HA, editors. *Textbook of Respiratory Medicine*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. SAUNDERS COMPANY; 2000;1587-91
6. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 1979;236:H818-H827
7. Stenmark KR, Fasules J, Hyde DM, Voelkel NF, Henson J, Tucker A, et al. Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *J Appl Physiol* 1987;62:821-830
8. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54
9. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510-5514
10. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604-13
11. Pintavorn P, Ballermann BJ. TGF- β and endothelium during immune injury. *Kidney Int* 1997;51:1401-12
12. Pepper MS. Transforming growth factor- β : vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:21-43
13. Smith JD, Bryant SR, Couper LL, Vary CP, Gotwals PJ, Kotliansky VE, et al. Soluble transforming growth factor- β type-II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth. *Circ Res* 1999;84:1212-22
14. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 1998;95(6):737-40
15. Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:235-43
16. Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor β -1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest* 1995;95:1363-9
17. Topper JN, Cai J, Qiu Y, Anderson KR, Xu YY, Deeds JD, et al. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9314-9
18. DiChiara MR, Kiely JM, Gimbrone MA Jr., Lee ME, Perrella MA, Topper JN. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *J Exp Med* 2000;192:695-704
19. Schmedtje JF Jr, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via NF κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:601-8
20. Yang X, Sheares KK, Davie N, Upton PD, Taylor GW, Horsley J, et al. Hypoxic induction of cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27: 688-96
21. Kapanici Y, Burgan S, Pietra GG, Conne B, Gabbisni G. Modulation of actin isoform expression in alveolar myofibroblasts (contractile interstitial cells) during pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1990;136:881-9
22. Adler KB, Low RB, Leslie KO, Mitchell J, Evans JN. Contractile cells in normal and fibrotic lung. *Lab Invest* 1989;60:473-85
23. Sims DE, Westfall JA. Analysis of relationships between pericytes and gas exchange capillaries in neonatal and mature bovine lungs. *Microvasc Res* 1983;25:333-42
24. Sims DE, Miller FN, Donald A, Perricone MA. Ultrastructure of pericytes in early stages of histamine-induced inflammation. *J Morphol* 1990;206:333-42
25. Tilton RG, Kilo C, Williamson JR, Murch DW. Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvasc Res* 1979;18:336-52

26. Tilton RG. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microsc Tech* 1991;19:327-344
27. D'Amore PA. Culture and study of pericytes. In: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, edited H. M. Piper, editor. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1990;299-314
28. Speyer CL, Steffes CP, Ram JL. Effects of vasoactive mediators on the rat lung pericyte: quantitative analysis of contraction on collagen lattice matrices. *Microvasc Res* 1999;57:134-43
29. Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashima T, Yamashita J, et al. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 1995; 270:28316-24
30. Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R, Fukuda N, Matthay MA, Crystal RG. Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22(6):657-64
31. Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, Millar AB. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1601-5
32. Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marme D. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res* 1997;57: 5421-5
33. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 2001;276:38527-35
34. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000;14:1983-91